

· 基础研究 ·

补阳还五汤上调 miRNA-210 表达促进人脑微血管内皮细胞血管生成

胡 辉 储利胜 孙斯琪 李 琳 方 燕 顾晶晶 张建平

摘要 **目的** 体外研究 miRNA-210 在补阳还五汤(Buyang Huanwu Decoction, BYHWD)促进人脑微血管内皮细胞(HBMECs)血管生成中的作用及其机制。**方法** 制备 BYHWD 含药血清,脂质体 2000 将 miRNA-210 inhibitor 转染至 HBMECs,HBMECs 分为空白血清组(10% 正常对照血清)、BYHWD 含药血清组(10% BYHWD 含药血清)、miRNA-210 inhibitor 阴性对照组(NC 10% BYHWD 含药血清 + miRNA-210 inhibitor NC)和 miRNA-210 inhibitor 组(10% BYHWD 含药血清 + miRNA-210 inhibitor);采用 MTT、Transwell 和管腔形成实验分别检测 HBMECs 增殖、迁移和管腔形成;qRT-PCR 检测 miRNA-210、血管内皮生长因子(VEGF)和血管内皮生长因子受体-2(VEGFR2) mRNA 表达,Western Blot 检测 VEGF 和 VEGFR2 蛋白表达。**结果** 与空白血清组比较,BYHWD 含药血清组 HBMECs 增殖、迁移和管腔形成增加($P < 0.01$),miRNA-210、VEGF 和 VEGFR2 mRNA 和蛋白表达增加($P < 0.01$)。与 BYHWD 含药血清组比较,miRNA-210 inhibitor 组 HBMECs 增殖、迁移和管腔形成减少($P < 0.01$),VEGF、VEGFR2 mRNA 和蛋白表达减少($P < 0.01$)。**结论** BYHWD 可促进 HBMECs 血管生成,其机制可能与其上调 miRNA-210 表达激活 VEGF 信号通路有关。

关键词 补阳还五汤;人脑微血管内皮细胞;微小 RNA-210;血管生成;血管内皮生长因子

Buyang Huanwu Decoction Promotes Human Brain Microvascular Endothelial Cells Angiogenesis through Upregulating miRNA-210 Expression HU Hui, CHU Li-sheng, SUN Si-qi, LI Lin, FANG Yan, GU Jing-jing, and ZHANG Jian-ping *Department of Physiology, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou(310053)*

ABSTRACT **Objective** To investigate the role of miRNA-210 on Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) inducing human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) *in vitro* and the underlying mechanisms. **Methods** BYHWD containing serum was prepared, miRNA-210 inhibitor was transfected into HBMECs by Lipofectamine 2000. HBMECs were divided into the blank serum group (10% normal control serum), BYHWD-containing serum group (10% BYHWD containing serum), miRNA-210 inhibitor negative control group (10% BYHWD containing serum + miRNA-210 inhibitor NC) and miRNA inhibitor group (10% BYHWD containing serum + miRNA-210 inhibitor). HBMECs proliferation, migration and tube formation were detected by MTT, transwell chamber and capillary-like tube formation assay after treated with BYHWD-containing serum, respectively. miRNA-210, VEGF and VEGFR2 mRNA expressions were examined by qRT-PCR. The protein expression of VEGF and VEGFR2 were assessed by Western Blot. **Results** Compared with the blank serum group. The proliferation, migration and tube formation of HBMECs of BYHWD containing serum group were significantly promoted ($P < 0.01$), miRNA-210, VEGF and VEGFR2 mRNA and protein expression were up-regulated ($P < 0.01$). Compared with BYHWD containing serum group, HBMECs proliferation, migration and tube formation of miRNA-210 inhibitor negative control group were decreased, VEGF and VEGFR2 mRNA and protein expression were down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** BYHWD could promote HBMECs angiogenesis, and the mechanism was related to activation of VEGF signaling pathway by upregulation of miRNA-210 expression.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81073075, No. 81274113);浙江省自然科学基金资助项目(No. Y207771)

作者单位:浙江中医药大学生理学教研室(杭州 310053)

通讯作者:储利胜, Tel: 0571-86633149, E-mail: chulisheng@21cn.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20171205.324

KEYWORDS Buyang Huanwu Decoction; human brain microvascular endothelial cells; miRNA-210; angiogenesis; vascular endothelial growth factor

缺血性脑卒中是成年人死亡和致残的主要原因。脑缺血后缺血周边区新生血管范围和密度越大,其死亡率越低、存活期越长,促进血管生成有助于脑组织修复和功能恢复^[1]。microRNAs(miRNAs)是一类长约 22 个核苷酸的内源性单链非编码小分子 RNA,通过与靶基因 mRNA 3'端非翻译区(3'-UTR)结合,调控多种基因表达,参与细胞增殖、迁移、分化和凋亡等过程^[2]。miRNA-210 是一种低氧相关 miRNA。体内外研究发现,缺氧诱导血管内皮细胞表达 miRNA-210,从而上调血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号通路促进血管生成^[3,4]。补阳还五汤是中医临床治疗脑缺血及其后遗症的代表方剂。笔者前期在体研究发现,补阳还五汤促进脑缺血后血管生成和神经功能恢复^[5,6]。体外研究发现,补阳还五汤含药血清促进人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cells, HBMECs)增殖和迁移^[7]。本实验进一步在体外观察补阳还五汤是否通过上调 miRNA-210 表达促进 HBMECs 血管生成。

材料与方法

1 动物与细胞 清洁级健康雄性 SD 大鼠,3 ~ 4 月龄,体重 250 ~ 300 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2013—0016,饲养在浙江中医药大学实验动物中心,室温(22 ± 1)℃,相对湿度 40% ~ 60%,12 h/12 h 明暗循环,自由饮食进水。HBMECs 细胞株购自美国模式培养物集成库。本实验经浙江中医药大学动物管理与伦理委员会批准(编号:ZSLL-2015-41),动物饲养管理和动物实验操作符合《浙江省实验动物管理条例》等法规的要求。

2 药物 补阳还五汤原方来源于《医林改错》,由黄芪 120 g 当归 6 g 川芎 4.5 g 赤芍 4.5 g 地龙 3 g 红花 3 g 桃仁 3 g 组成,所有药材均购自浙江中医药大学中医门诊部。以上药物加水浸泡 2 h,水煎两次,每次 40 min,合并后浓缩为含生药 2 g/mL。

3 试剂及仪器 RPMI1640 培养基(杭州吉诺生物技术有限公司,批号:2016103104);胰酶(杭州吉诺生物技术有限公司,批号:2016122701);优级胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号:1527494);MTT(美国 Sigma 公司,批号:MKBG9627V);Matrigel 基底膜基质(美国 BD 公司,批号:2263558);Lipofectamine 2000 Reagent(美国 Invitrogen 公司,批

号:1734976);miRNA-210 inhibitor 阴性对照 miRNA-210 inhibitor negative control,miRNA-210 inhibitor NC,广州锐博生物科技有限公司,批号:2215cy3);miRNA-210 inhibitor(广州锐博生物科技有限公司,批号:00728);Trizol Reagent(日本 TaKaRa 公司,批号:AKA2306);逆转录 PCR 试剂盒(美国 clontech 公司,批号:H041802B);SYBR Premix Ex Taq TM II(日本 TaKaRa 公司,批号:AK9203);miRNA-210 上游引物 5'-TATTAGCCCCTGCCACCGC-3'(批号:83039798702),下游引物 5'-ATCCAGTG-CAGGGTCCGAGG-3'(批号:83039798701);VEGF 上游引物 5'-GGGTAGCTCGGAGGTCGT-3'(批号:83039798707),下游引物 5'-CTGACCGGTCCAC-CTAACC-3'(批号:83039798706);VEGFR2 上游引物 5'-GAGAGCGGTCAATGTGTG GT-3'(批号:83039798705),下游引物 5'-GGTGCCGGTAG-GAGAGGATA-3'(批号:83039798704);U6 上游引物 5'-AGAGAAGATTAGCATGGCCC-3'(批号:1701054A),下游引物 5'-ATCCAGTGCAGGGTC-CGAGG-3'(批号:1510938A),GAPDH 上游引物 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'(批号:9302259424),下游引物 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'(批号:9302259425),上述引物均购自上海生工生物工程股份有限公司;SDS-PAGE 凝胶试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:041117170411);兔抗 VEGF 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号:A0714);鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,sc-47724);兔抗 VEGFR2 单克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号:GR21043-1);辣根过氧化物酶标记羊抗兔(北京中杉金桥生物技术有限公司,ZDR-5306);羊抗鼠二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,ZDR-5307);CO₂细胞培养箱(日本 SANYO 公司,型号:MCO-5AC);超净台(江苏净化设备有限公司,型号:SW-CJ-2F);倒置相差显微镜(德国 Leica 公司,DMIL LED);全自动酶标仪(美国 Bio-Tek 公司,型号:ELx800);实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:iQ5);紫外可见分光光度计(美国 Thermo 公司,型号:Varioskan Flash);垂直电泳转膜系统(美国 Bio-Rad 公司,型号:PowerPact Basic);PVDF 膜(美国 Millipore,批号:K5NA8025F);凝胶图像处理系统(美国 Bio-Rad 公司,型号:Universal Hood II)。

4 补阳还五汤含药血清制备 大鼠按随机数字法分为正常对照组和补阳还五汤(BYHWD)组。BYHWD 组给予 BYHWD (13 g/kg)灌胃,正常对照组给予等量生理盐水,2 次/日,连续 3 日。末次给药 2 h 后,腹主动脉取血,室温静置 2 h,4 000 r/min,4 ℃离心 15 min,收集的血清于 56 ℃水浴中灭活 30 min,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,分装,-20 ℃保存备用。

5 细胞转染与分组 HBMECs 复苏后,用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基在 37 ℃、5% CO₂培养箱内培养,待细胞贴壁生长融合至 80%~90%时传代。取生长状态良好的 HBMECs 细胞,加不含双抗的培养基培养,待细胞完全贴壁融合至 80%左右时进行转染。细胞转染按照脂质体 2000 说明书进行,miRNA-210 inhibitor 转染浓度为 100 nmol/L。设空白血清组(10%正常对照血清),BYHWD 含药血清组(10% BYHWD 含药血清),miRNA-210 inhibitor NC 组(10% BYHWD 含药血清 + miRNA-210 inhibitor NC),miRNA-210 inhibitor 组(10% BYHWD 含药血清 + miRNA-210 inhibitor)。

6 观察指标及检测方法

6.1 细胞增殖 转染 24 h 后,胰酶消化 HBMECs,加入含 10% FBS 完全培养基重悬细胞,调整细胞密度为 1 × 10⁵个/mL,以每孔 100 μL 细胞悬液加入到 96 孔板中。各组加相应血清或药物,置于 37 ℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱内孵育。24 h 后弃培养基,每孔加入终浓度 0.5 mg/mL 含 MTT 的 PBS 缓冲液 100 μL,继续孵育 4 h,每孔加入 150 μL DM-SO,振荡混匀 10 min。待沉淀完全溶解后,酶标仪上 490 nm 检测各孔 OD 值。每组设 6 个复孔。

6.2 Transwell 实验 将 Martrigel 基质胶均匀铺在 Transwell 小室,下层加入 600 μL 的 5% FBS 培养基。消化转染的细胞,小室内接种 200 μL 细胞悬液(8 × 10⁴个/每小室)。各组加相应血清或药物,培养 24 h 后,用棉签轻轻擦掉小室内侧底面未迁移的细胞,4%多聚甲醛室温固定 10 min,0.1%结晶紫室温染色 15 min,倒置相差显微镜下拍照、计数。

6.3 管腔形成实验 将 Martrigel 基质胶均匀铺在 24 孔板,将细胞按 2 × 10⁴个/孔细胞接种至 24 孔板,各组加相应血清或药物,置于 37 ℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱内孵育 24 h 后,计算管腔样结构数量。

6.4 qRT-PCR 检测 按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,逆转录成 cDNA。Real-time PCR 按照 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒说明书进行。反应条件为:95 ℃ 预变性 3 min,然后 95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,40 个循环,每个样品设 3 个

复孔,结果计算 2^{-ΔΔCt}进行相对表达量分析。

6.5 Western Blot 检测 消化收集细胞,加入 200 μL 蛋白裂解液,4 ℃ 8 000 r/min 离心 10 min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度。根据 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒说明书配胶,进行电泳,转膜,封闭,分别加入 VEGF 和血管内皮生长因子受体-2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)一抗(1:1 000)孵育,4 ℃静置过夜。洗膜后加入二抗(1:2 000),室温 2 h,充分洗涤,ECL 显色,显影成像分析系统分析结果。内参使用 GAPDH,以目标蛋白/GAPDH 灰度比值为统计量。

7 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析并 SNK 进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 HBMECs miRNA-210 表达比较(表 1) 血清孵育 24 h 后,与空白血清组比较,BYHWD 含药血清组 miRNA-210 表达显著增加($P < 0.01$)。

表 1 各组 HBMECs miRNA-210 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miRNA-210/2 ^{-ΔΔCt}
空白血清	6	1.00 ± 0.03
BYHWD 含药血清	6	3.35 ± 0.28 [*]

注:与空白血清组比较,^{*} $P < 0.01$

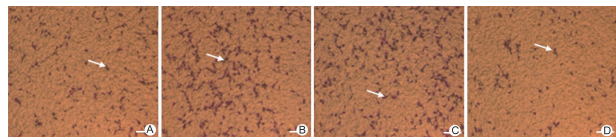
2 各组 HBMECs 增殖比较(表 2) 与空白血清组比较,BYHWD 含药血清组 HBMECs 增殖显著增加($P < 0.01$);与 BYHWD 含药血清组比较,miRNA-210 inhibitor 组 HBMECs 增殖显著减少($P < 0.01$),而 miRNA-210 inhibitor NC 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 各组 HBMECs 迁移细胞数量比较(表 2,图 1) 与空白血清组比较,BYHWD 含药血清组 HBMECs 迁移数量显著增多($P < 0.01$);与 BYHWD 含药血清组比较,miRNA-210 inhibitor 组 HBMECs 迁移数量显著减少($P < 0.01$),而 miRNA-210 inhibitor NC 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组 HBMECs 增殖、迁移细胞数和管腔形成数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD 值	细胞数 (个/视野)	管腔数 (个/视野)
空白血清	6	0.501 ± 0.012	97 ± 8	12.5 ± 1.3
BYHWD 含药血清	6	0.632 ± 0.031 [*]	121 ± 10 [*]	28.3 ± 2.5 [*]
miRNA-210 inhibitor NC	6	0.624 ± 0.083	126 ± 10	26.8 ± 3.6
miRNA-210 inhibitor	6	0.483 ± 0.012 ^Δ	76 ± 12 ^Δ	10.6 ± 2.9 ^Δ

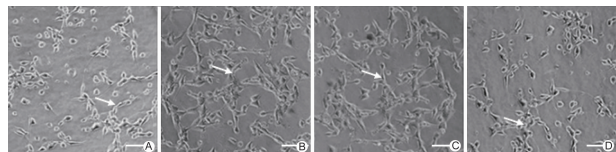
注:与空白血清组比较,^{*} $P < 0.01$;与 BYHWD 含药血清组比较,^Δ $P < 0.01$



注:A 为空白血清组;B 为 BYHWD 含药血清组;C 为 miRNA-210 inhibitor NC 组;D 为 miRNA-210 inhibitor 组;箭头所指为 HBMECs

图 1 各组 HBMECs 迁移的细胞数量比较
(比例尺:50 μm)

4 各组 HBMECs 管腔形成数量比较(表 2, 图 2) 与空白血清组比较, BYHWD 含药血清组 HBMECs 管腔形成数量显著增多($P < 0.01$); 与 BYHWD 含药血清组比较, miRNA-210 inhibitor 组管腔形成数量显著减少($P < 0.01$), 而 miRNA-210 inhibitor NC 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注: A 为空白血清组;B 为 BYHWD 含药血清组;C 为 miRNA-210 inhibitor NC 组;D 为 miRNA-210 inhibitor 组;箭头所指为管腔

图 2 各组 HBMECs 形成毛细血管样管腔数量比较
(比例尺:50 μm)

5 各组 HBMECs 的 VEGF 和 VEGFR2 mRNA 表达比较(表 3) 与空白血清组比较, BYHWD 含药血清组 VEGF 和 VEGFR2 mRNA 表达显著增加($P < 0.01$); 与 BYHWD 含药血清组比较, miRNA-210 inhibitor 组 VEGF 和 VEGFR2 mRNA 表达显著减少($P < 0.01$), 而 miRNA-210 inhibitor NC 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 各组 HBMECs 的 VEGF 和 VEGFR2 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VEGF/2 ⁻ $\Delta\Delta\text{Ct}$	VEGFR2/2 ⁻ $\Delta\Delta\text{Ct}$
空白血清	6	1.000 $\pm$ 0.024	1.000 $\pm$ 0.032
BYHWD 含药血清	6	2.052 $\pm$ 0.312 [*]	1.827 $\pm$ 0.198 [*]
miRNA-210 inhibitor NC	6	2.051 $\pm$ 0.132	2.104 $\pm$ 0.263
miRNA-210 inhibitor	6	0.682 $\pm$ 0.061 [△]	0.584 $\pm$ 0.051 [△]

注:与空白血清组比较,^{*} $P < 0.01$;与 BYHWD 含药血清组比较,[△] $P < 0.01$

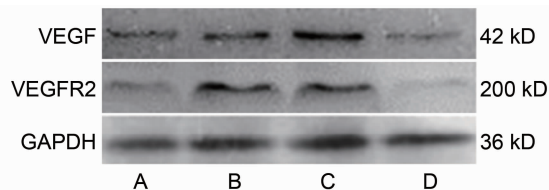
6 各组 HBMECs 的 VEGF 和 VEGFR2 蛋白表达比较(表 4, 图 3) 与空白血清组比较, BYHWD 含药血清组 VEGF 和 VEGFR2 蛋白表达显著增加($P < 0.01$); 与 BYHWD 含药血清组比较, miRNA-210 in-

hibitor 组 VEGF 和 VEGFR2 蛋白表达显著减少($P < 0.01$), 而 miRNA-210 inhibitor NC 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 4 各组 HBMECs 的 VEGF 和 VEGFR2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VEGF/GAPDH	VEGFR2/GAPDH
空白血清	6	0.26 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.06
BYHWD 含药血清	6	0.50 $\pm$ 0.08 [*]	0.55 $\pm$ 0.13 [*]
miRNA-210 inhibitor NC	6	0.58 $\pm$ 0.12	0.54 $\pm$ 0.12
miRNA-210 inhibitor	6	0.22 $\pm$ 0.06 [△]	0.15 $\pm$ 0.04 [△]

注:与空白血清组比较,^{*} $P < 0.01$;与 BYHWD 含药血清组比较,[△] $P < 0.01$



注:A 为空白血清组;B 为 BYHWD 含药血清组;C 为 miRNA-210 inhibitor NC 组;D 为 miRNA-210 inhibitor 组

图 3 各组 HBMECs 的 VEGF 和 VEGFR2 蛋白表达

讨 论

血管生成包括内皮细胞增殖、迁移、管腔形成和成熟等多个步骤,在缺血性疾病的发展、治疗和预后中发挥重要作用^[8]。本研究发现补阳还五汤含药血清促进 HBMECs 增殖、迁移和管腔形成,进一步在体外证实补阳还五汤促进血管生成。更为重要的是,笔者发现补阳还五汤上调 HBMECs 的 miRNA-210 表达,采用脂质体 2000 转染 miRNA-210 inhibitor 后,补阳还五汤含药血清促进 HBMECs 增殖、迁移和管腔形成的作用被抑制,同时 VEGF 及其受体 VEGFR2 mRNA 和蛋白表达下降。

miRNAs 是一类内源性非编码单链小分子 RNA,可调控多种基因表达,参与细胞增殖、分化、迁移、存活和凋亡等病理生理过程^[2]。近年来研究发现,miRNA 在血管生成中发挥重要作用^[9,10]。miRNA-210 是一种缺氧相关的 miRNA。研究发现,缺氧诱导内皮细胞表达 miRNA-210,沉默或过表达 miRNA-210 证实 miRNA-210 促进内皮细胞迁移、存活和管腔形成^[3,4]。脑缺血后缺血皮层 miRNA-210 表达增加,慢病毒载体介导 miRNA-210 过表达促进缺血脑组织血管生成^[11,12]。此外,研究发现正常大鼠脑组织过表达 miRNA-210 促进局部血管生成^[13]。本研究发现,补阳还五汤含药血清上调 HBMECs 的 miRNA-210 表达,采用脂质体 2000 转染 miRNA-

210 inhibitor 后,HBMECs 的增殖、迁移和管腔形成减少。上述结果表明,miRNA-210 介导补阳还五汤含药血清促进 HBMECs 血管生成。

血管生成受到多种血管生长因子调控,其中 VEGF 信号通路作用非常重要。VEGF 与 VEGFR2 结合促进内皮细胞增殖、迁移和管腔形成^[14]。以往研究发现,miRNA-210 主要是通过下调靶基因 ephrinA3 表达促进血管生成^[3,15]。ephrins 家族在 VEGF 信号通路调控血管生成过程中发挥重要作用^[16]。娄远蕾等^[15]发现 miRNA-210 过表达下调靶基因 ephrinA3 表达,上调 HUVECs 的 VEGF 表达,促进内皮细胞迁移进而形成毛细血管管腔结构。Liu F 等^[4]研究发现,肾脏缺血再灌注损伤上调 miRNA-210 表达,从而促进内皮细胞 VEGF 及其受体 VEGFR2 表达诱导血管生成。Zeng L 等^[13]在体研究发现 miR-210 通过上调 VEGF 表达促进正常脑组织血管生成。Wang J 等^[17]研究发现活血安心方通过上调 miRNA-210 和 VEGF 表达促进急性心梗后心肌血管生成。笔者前期研究发现,补阳还五汤上调脑缺血后 VEGF 和 BDNF 表达促进神经发生和血管生成^[6,18]。在本研究发现补阳还五汤含药血清促进 HBMECs 的 VEGF、VEGFR2 mRNA 和蛋白表达增加,转染 miRNA-210 inhibitor 后,VEGF、VEGFR2 mRNA 和蛋白表达下降。上述结果表明,补阳还五汤通过上调 miRNA-210 促进 VEGF、VEGFR2 mRNA 和蛋白表达。

总之,本研究结果表明,补阳还五汤体外促进 HBMECs 增殖、迁移和管腔形成,机制可能与其上调 miRNA-210 表达激活血管内皮细胞 VEGF 信号通路有关。

利益冲突:作者声明无竞争性利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, et al. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke[J]. *Stroke*, 1994, 25(9): 1794-1798.
- [2] Van Wynsberghe PM, Chan SP, Slack FJ, et al. Analysis of microRNA expression and function[J]. *Methods Cell Biol*, 2011, 106: 219-252.
- [3] Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-a3[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(23): 1578-1583.
- [4] Liu F, Lou YL, Wu J, et al. Upregulation of microRNA-210 regulates renal angiogenesis mediated by activation of VEGF signaling pathway under ischemia/perfusion injury *in vivo* and *in vitro* [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2012, 35(3): 182-191.
- [5] 储利胜, 姜艳艳, 柯庆, 等. 补阳还五汤促进大鼠局灶性脑缺血后血管生成和功能恢复[J]. *中华中医药学刊*, 2011, 29(2): 335-337.
- [6] 李琳, 刘志婷, 储利胜, 等. 补阳还五汤诱导脑缺血后血管生成促进侧脑室下区神经母细胞迁移[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(2): 298-305.
- [7] 叶淑静, 孙斯琪, 李琳, 等. 补阳还五汤含药血清对人脑微血管内皮细胞增殖和迁移的影响[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2016, 26(10): 887-889.
- [8] Hayashi T, Deguchi K, Nagotani S, et al. Cerebral ischemia and angiogenesis[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2006, 3(2): 119-129.
- [9] Suarez Y, Sessa WC. MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis[J]. *Circ Res*, 2009, 104(4): 442-454.
- [10] Yin KJ, Hamblin M, Chen YE. Angiogenesis-regulating microRNAs and ischemic stroke[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2015, 13(3): 352-365.
- [11] Lou YL, Guo F, Liu F, et al. miR-210 activates notch signaling pathway in angiogenesis induced by cerebral ischemia[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 370(1-2): 45-51.
- [12] Zeng LL, He XS, Liu JR, et al. Lentivirus-mediated overexpression of microRNA-210 improves long-term outcomes after focal cerebral ischemia in mice[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2016, 22(12): 961-969.
- [13] Zeng L, He X, Wang Y, et al. MicroRNA-210 overexpression induces angiogenesis and neurogenesis in the normal adult mouse brain[J]. *Gene Ther*, 2014, 21(1): 37-43.
- [14] Hansen TM, Moss AJ, Brindle NP. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in neurovascular regeneration and protection following stroke[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2008, 5(4): 236-245.
- [15] 娄远蕾, 高法梁, 谢安, 等. microRNA-210 基因修饰人脐静脉内皮细胞诱导血管形成[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2012, 26(5): 587-591.
- [16] Kuijper S, Turner CJ, Adams RH. Regulation of angiogenesis by Eph-ephrin interactions[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2007, 17(5): 145-151.
- [17] Wang J, Zhang Y, Liu YM, et al. Huoxue Anxin Recipe promotes myocardium angiogenesis of acute myocardial infarction rats by up-regulating miR-210 and vascular endothelial growth factor[J]. *Chin J Integr Med*, 2016, 22(9): 685-690.
- [18] 曲铁兵, 俞天虹, 刘志婷, 等. 补阳还五汤及其拆方对大鼠脑缺血后神经发生的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(3): 342-347.

(收稿: 2017-08-21 在线: 2017-12-30)

责任编辑: 赵芳芳